

# Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan.

---

## CONTENTS

- Suttekiti MARUYAMA: Über die Synthese einiger Methoxymethylalkylketone und ihre Beziehung zum Aroma der Gärungsprodukte. ... 1
- Sogo TETSUMOTO: Sterilising Action of Acids. 2nd Report.—Sterilising action of saturated monobasic fatty acids. ... 8
- Kazuo YAMAFUJI: Über die protease und Amylase des Blutes der Seidenraupe (*Bombyx mori*, L.). ... 19
- K. KONISHI und T. TSUGE: Über die Begünstigung des Azotobacter-Wachstums durch mineralische Stoffe aus Bodenextrakten. ... 23
- R. TSUNOKAYE and G. ENOMOTO: Electro-Conductivity of Textile Fibres. ... 26
- R. SAITO: Content of Vitamin C in Canned Satsuma Orange (*Citrus Unshiu*, Marc.). Preliminary Report. ... 28
- A. ITANO: Investigation on the Influence of Aerial-Earth Circuit on the Biological Activities. I. Influence on Azotobacter chroococcum. ... 31
- Y. KISHI: Studies on the Proteins Contained in Mulberry Leaves. Part I. On the Kinds of the Protein-Nitrogen Contained in Mulberry Leaves, and the Comparison of the Quantities of the Protein-Nitrogen Contained in Different Parts of the Mulberry Tree. ... 37

---

Published by the  
Agricultural Chemical Society of Japan

c/o Faculty of Agriculture, Tokyo Imperial University.

---

Single Copy (Postage inclusive) :-	¥ 0.35
Annual Subscription (12 numbers) :-	¥ 3.50

## *The Agricultural Chemical Society of Japan.*

President : Kintaro OHSHIMA.

The Council of the Agr. Chem. Soc. of Japan has decided to publish English Abstract of those papers appearing in the Journal in a separate form in order to facilitate the circulation in foreign countries.

Bulletin of the Agr. Chem. Soc. of Japan is published for this purpose from May 1926 monthly. The numbering begins with Vol. 2, No. 5. The earlier parts are represented by the English abstracts published in the Journal annexed to the Japanese texts.

The articles to be appeared in the Bulletin must be concise, supplied with experimental methods and data and understandable, without specially referring to the Japanese texts. It ought, however, not exceed four printed pages as a rule. Any longer articles may be accepted according to the decision of the Council, with or without charge for exceeding pages.

Journal of the Agr. Chem. Soc. of Japan will be published in Japanese as formerly. Those desiring the detailed information of the articles appeared in the Bulletin may look for in the Journal of the same Number or the same Volume.

Editor : Kintaro OHSHIMA.

Associate Editors : Kakuji GOTŌ and Yoshikazu SAHASHI.

---



# Über die Synthese einiger Methoxymethyl-alkyl-ketone und ihre Beziehung zum Aroma der Gärungsprodukte.

Von

Suttekiti MARUYAMA.

(aus d. U. Suzuki-Biochem. Laborat. des Instituts für  
Physikalische und Chemische Forschung, Tokyo.)

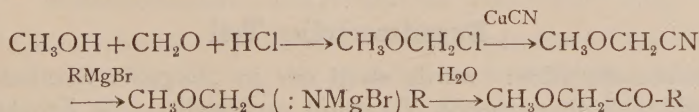
(Eingegangen am 10. November 1932.)

Mit der Absicht, das Aroma verschiedener Gärungsprodukte zu studieren, hat der Verfasser vor einigen Jahren in Gemeinschaft mit T. HIGASI zuerst das *Acetoin* od. *Butan-2-ol-3-on* in optisch inaktiver Form rein dargestellt und den Geruch genau durchprobiert<sup>(1)</sup>. Das *Acetoin* ist bekanntlich in verschiedenen Gärungsprodukten enthalten. Neulich ist es auch im japanischen „*Saké*“ (Reiswein) nachgewiesen worden. Es hat eigentümlichen, angenehmen Geruch, der dem Aroma des *Sakés* ähnelt. Es wurde von mehreren geübten *Saké*-Kennern im hiesigen Institut sorgfältig untersucht. Nach der Beurteilung dieser Fachleute scheint es jedoch nicht die wichtigste Rolle bei der Qualität des *Sakés* zu spielen, obgleich es Nebenbestandteil seines Aromas bildet.

In Fortsetzung dieser Untersuchung hat der Verfasser neuerdings 4 neue Homologe des *Acetoin-methyläthers* von folgenden Formeln in reinem Zustande dargestellt:

- I.  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_2\text{H}_5$   
*Methoxymethyl-äthyl-keton* (od. *1-Methoxy-butan-2-on*)
- II.  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_3\text{H}_7$  (*n*)  
*Methoxymethyl-n-propyl-keton* (od. *1-Methoxy-pentan-2-on*)
- III.  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_4\text{H}_9$  (*n*)  
*Methoxymethyl-n-butyl-keton* (od. *1-Methoxy-n-hexan-2-on*)
- IV.  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH (CH}_3)_2$   
*Methoxymethyl-isocamyl-keton* (od. *1-Methoxy-5-methyl-hexan-2-on*)

Die Darstellung erfolgte wesentlich nach der Methode von D. Gauthier<sup>(2)</sup>, die er zur Synthese der analogen Äthoxy-derivate verwendet hat, und zwar nach folgendem Schema:



Ferner hat der Verfasser zur Charakterisierung der oben erwähnten Ketoläther die *Semicarbazone* und 2, 4-*Dinitrophenylhydrazone* hergestellt. Die Formeln, Farbe und Schmelzpunkte derselben werden im folgenden zusammengestellt:

Formel $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-R}$	Semicarbazon $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-C(=N-NHCO-NH}_2\text{)-R}$	2, 4-Dinitrophenylhydrazon $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-C(=N-NH-C}_6\text{H}_3\text{(NO}_2\text{)}_2\text{)R}$	
	Schmelzp.	Schmelzp.	Farbe
I. $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{COC}_2\text{H}_5$	84~85°	193~198.5°	Orange
II. $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_3\text{H}_7$	97~98°	128.5~129°	"
III. $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_4\text{H}_9$ (n)	95°	93°	Seidenglänzend Hellgelb
IV. $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-C}_5\text{H}_{11}$ (iso)	106~106°	109.5°	Gelb

Es sei hier bemerkt, dass Semicarbazone, wie die entsprechenden ursprünglichen Ketoläther, mehr oder weniger leicht löslich in Wasser sind und dass besonders das erste (I) so leicht löslich ist, dass es sich aus der wässrigen Lösung nicht abscheidet, sondern erst durch Sättigen mit Natrium-acetat abgeschieden wird, was bereits von M. Sommelet<sup>(3)</sup> in einem analogen Falle berichtet wurde.

Die Gerüche der oben erwähnten Ketoläther wurden in verschiedener Weise probiert, z. B. 1) als solche ohne Verdünnung, 2) als 5~10% ige Lösung in 15% Alkohol, oder 3) in kleinsten Mengen zu gebräutem oder synthetischem *Saké* zugesetzt. Der letztere ist seit einigen Jahren im hiesigen Institut technisch dargestellt worden. In der Weise wurde festgestellt, dass diese Ketoläther, wie es bei den meisten Riechstoffen der Fall ist, in reinem Zustande nicht angenehm riechen. Erst sehr verdünnt, entfalten sie den ihnen eigentümlichen Duft. Sie zeigen aber weder so kräftigen, lebendigen Geruch, wie z. B. Terpinylacetat, noch so süßen Duft, wie Blütenextrakt. Sie ähneln vielmehr dem Frucht- als dem Blütenaroma. Unter 4 Ketoläthern riechen I und II in 0.1% iger Lösung in 15% Alkohol anfangs ätherartig, später mehr esterartig, etwas an Acetoin und Acetol erinnernd. III und IV riechen in der oben angegebenen Konzentration zu stark und etwas widrig. In noch verdünnterer Lösung werden sie angenehm, trotzdem sie einen butterartigen Geruch mit etwas schimmelartigem Beitone entfalten. Der Ketoläther (IV) riecht ähnlich wie Cyclohexyl-acetat. In wasserverdünntem Alkohol in geringen Mengen zugesetzt, gibt er einen angenehmen Geruch, doch scheint es nicht das charakteristische Aroma des *Sakés* zu sein.

Der Verfasser beabsichtigt weiter noch höhere Glieder der Ketoläther herzustellen, um deren Aroma zu studieren.

### Experimenteller Teil

*Monochlor-methyläther*: wurde nach der in „Organic Synthesis Bd. IX, S. 58“ ausführlich angegebenen Vorschrift dargestellt. Als Trocknungsmittel wurde anstatt Chlorcalcium Phosphorpentoxyd verwendet. Um die ganze Operation mit der angegebenen Menge der Ausgangsmaterialien in der erwähnten Zeit auszuführen, sollte man möglichst rasch in reichlicher Menge trockenes Salzsäuregas in die Reaktionsmischung einleiten.



*Methoxy-acetonitril*: In einem mit gut wirkendem Rückflusskühler versehenen 1/2 l-Rundkolben, der am obersten Ende des Kühlers ein  $\text{CaCl}_2$ -Rohr zum Abschluss der Feuchtigkeit besitzt, werden 102 g Kupfercyanür, die bei  $120^\circ$  zur Gewichtskonstante getrocknet und fein gepulvert worden sind, mit 92 g Monochlor-methyläther unter Umschütteln gut benetzt. Bisweilen fängt die Reaktion nach etwa 10 Minuten unter gelinder Selbsterwärmung an. Wenn es aber nicht der Fall ist, muss man den Kolben vorsichtig in warmes Wasser von etwa  $50^\circ$  eintauchen, bis die Reaktion eben einsetzt. Man hüte sich dabei, dass die Reaktion nicht zu weit geht. Sonst findet manchmal unkontrollierbares Selbstaufkochen statt, und die Ausbeute wird dementsprechend schlechter. Am zweckmässigsten schüttelt man den Kolben und lässt etwa 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen, bis die erste Reaktion völlig zum Stillstand kommt. Dann erwärmt man sorgfältig im Wasserbade von  $50 \sim 56^\circ$ . Die Reaktion beginnt wieder von Rand des Kolbens. Es wird durch abwechselnde Erwärmung und Kühlung reguliert, bis sich keine Blasen mehr entwickeln und der Inhalt des Kolbens zu steinharten Kuchen erstarrt, bei dem es sich vermutlich um ein Additionsprodukt des Kupfercyanürs handelt.

Nun erhitzt man nach Belieben den Kolben in kochendem Wasserbade. Die harte Masse wird dadurch allmählich unter Abscheidung des Kupferchlorürs dünnflüssig und verwandelt sich schliesslich in eine dunkelbraune Flüssigkeit. Der ganze Prozess nimmt bis dahin etwa 45 Minuten in Anspruch. Um die Reaktion zu vervollständigen, kocht man weiter 20 Minuten im Ölbad, bringt die Flüssigkeit, während sie noch heiss ist, in einen einfachen Destillierkolben von etwa 20 ccm Inhalt, und destilliert unter Erhitzen in einem Ölbad (Badtemperatur: anfangs  $150^\circ$ , zuletzt  $210^\circ$ ) zuerst bei gewöhnlichem, später bei vermindertem Drucke (ca. 50 mm) so lange, bis kein Destillat mehr übergeht. Das vereinigte Destillat beträgt 71 g. Es wird noch zweimal fraktionierter Destillation unterworfen. Die sehr geringe erste Fraktion enthält das isomere Isonitril und riecht widrig. Die Hauptfraktion, die bei  $110 \sim 122^\circ$  (hauptsächlich bei  $119^\circ$ ) übergeht, bildet reines Methoxy-acetonitril. Es ist wasserklare Flüssigkeit und riecht ähnlich wie Ethylacetat, aber angenehmer. In zugeschmolzenem Rohr aufbewahrt, bleibt es nach 5 Monaten noch unverändert. Ausbeute sehr gut.

#### METHOXYMETHYL-ALKYL-KETONE $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-CO-R}$ .

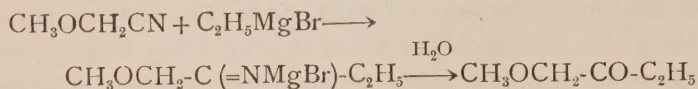
Vier Methoxymethyl-alkyl-ketone von der allgemeinen Formel  $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{-COR}$  wurden durch Umsetzung des Methoxy-acetonitrils mit den entsprechenden Grignardschen Reagenzien in wesentlich derselben Weise dargestellt. Im folgenden wird nur ein Beispiel von *Methoxymethyl-äthyl-keton* angegeben.

#### *Methoxymethyl-äthyl-keton* oder *1-Methoxy-butan-2-on* (I).

Wie bereits erwähnt, verläuft die Reaktion zwischen Methoxyacetonitril



und Alkyl-magnesium-bromid nach folgendem Schema :



Man bereitet zunächst in üblicher Weise in Wasserstoffatmosphäre eine Lösung von Äthyl-Mg-bromid aus 17 g (0.7 Mol) Mg-Spänen, 76 g (0.7 Mol) Äthylbromid und etwa 230 ccm absolutem Äther und gibt dazu eine Lösung von 35 g (0.5 Mol) Methoxy-acetonitril im gleichen Volumen absoluten Äthers tropfenweise unter Kühlung mit Eiswasser zu. Die Reaktion tritt sehr lebhaft ein, und es scheidet sich ein weisser Niederschlag aus, der anfangs rasch verschwindet, später aber ungelöst bleibt. Nach dem Zusatz der ganzen Menge Methoxy-acetonitril lässt man das Reaktionsgemisch über Nacht stehen. Dann wird es 30~40 Minuten auf dem Wasserbade in gelindem Sieden erhalten, mit Kaltemischung gekühlt und mit Eiswasser versetzt. Es scheidet sich dadurch Magnesiumoxyd ab. Man gibt nun soviel kalte 20%ige Schwefelsäure zu, bis der abgeschiedene Niederschlag wieder klar gelöst ist und die Lösung schwach sauer reagiert. Nach kurzem Stehen wird die ätherische Schicht von den wässrigen getrennt und der Äther auf dem Wasserbade abgedampft. Die dadurch zurückgebliebene Flüssigkeit wird mit der wässrigen Lösung vereinigt, und nach dem Zusatz von kleinen Mengen Natriumcarbonat destilliert man den Ketoläther mit Wasserdampf ab, der sich teilweise als Öl abscheidet. Die Destillation wird so lange fortgesetzt, bis das Destillat beim Sättigen mit wasserfreiem Kaliumcarbonat kein Öl mehr abscheidet. Das vereingte Destillat wird nun mit Kaliumcarbonat gesättigt und der dadurch ausgeschiedene rohe Ketoläther mit 40%iger wässriger Lösung von 52 g (0.5 Mol) reinem Natriumbisulfid gut geschüttelt, dreimal mit Äther extrahiert, um Verunreinigungen zu entfernen, wieder mit einer gesättigten Kaliumcarbonatlösung bis zu deutlicher alkalischer Reaktion versetzt und in der oben erwähnten Weise mit Wasserdampf destilliert. Aus dem wässrigen Destillat scheidet sich nach dem Sättigen mit Kaliumcarbonat das Methoxymethyl-äthylketon als Öl ab, das mit Chlorcalcium entwässert, sorgfältig filtriert und schliesslich durch 2~3 malige fraktionierte Destillation gereinigt wird. Die Ausbeute an reinem Produkt beträgt 20 g. Siedepunkt etwa 130°.

Bei der Darstellung der oben erwähnten Ketoläther seien noch folgende Bemerkungen gemacht.

1) Die Umsetzung des Methoxy-acetonitrils mit Grignardschen Reagenzien verläuft mit zunehmenden Kohlenstoffzahlen der letzteren immer langsamer. So muss man z. B. bei Äthyl-magnesium-bromid mit Eiswasser abkühlen, um die Reaktion zu ermässigen; bei *n*-Butyl-magnesium-bromid braucht man zu diesem Zwecke Wasser von etwa 15°, während bei Iso-Amyl-magnesium-chlorid etwas höhere Temperatur nötig ist.

2) Bei der Zersetzung der Additionsprodukte des Methoxy-acetonitrils mit Grignardschen Reagenzien durch Zusatz von Eiswasser muss man mit

einem Glasstabe tüchtig umrühren, um das Berühren des Wassers mit den Additionsprodukten zu beschleunigen, da sonst die Umsetzung durch abgeschiedene Magnesiumoxyde stark gestört wird.

3) Um die Reaktionsprodukte von dem entstandenen Kupferchlorür möglichst rasch bei niederer Temperatur abzudestillieren, ist es am zweckmässigsten, einen kleinen Destillierkolben, der am untersten Teile des Halses mit einem Ableitungsrohr versehen ist, zu verwenden.

*Semicarbazon des Methoxymethyl-äthyl-ketons*: 1.5 g krystallisiertes Natriumacetat werden in 1.2 ccm Wasser heiss gelöst, gekühlt und mit 1.2 g Semicarbazidhydrochlorid unter Umrühren versetzt, bis das letztere gelöst ist. Gibt man nun 1 g Ketoläther dazu, so tritt gelinde Selbsterwärmung ein. Nach etwa 3-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur fügt man noch 2.5 g Natriumacetat zu und lässt 24 Stunden stehen, bis das allmählich sich abscheidende Semicarbazon nicht mehr zunimmt. Hierauf saugt man ab, und es wird sofort ohne Auswaschen über Chlorcalcium getrocknet und zuerst aus Benzin (Siedep. 105 ~ 110°), dann dreimal aus dem Gemisch von Benzol und Benzin (Siedep. 70 ~ 90°) umkrystallisiert. In der Weise erhält man das Semicarbazon als reine schneeweisse Blättchen, Schmelzp. 84~85°.

Analyse: 3.274 mg Subst. gaben 5.425 mg CO<sub>2</sub> und 2.437 mg H<sub>2</sub>O  
 4.065 mg Subst. gaben 0.921 ccm N<sub>2</sub> (19°, 754 mm)  
 C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> (159.1) Ber. C 45.25 H 8.23 N 26.39%  
 Gef. " 45.19 " 8.33 " 26.27%

Es löst sich leicht in Alkohol, ziemlich leicht in Wasser, aber schwer in einer mit Natriumacetat gesättigten Lösung.

*2,4-Dinitrophenylhydrazon des Methoxymethyl-äthyl-ketons* wurde nach der allgemeinen, für wasserlösliche Carbonylverbindungen geeigneten Methode dargestellt: i. e. 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wird mit 6 ccm 2 N Salzsäure, dann mit 5 ccm konz. Salzsäure gut verrührt und schliesslich mit 300 ccm 2 N Salzsäure versetzt. Das Gemisch wird lange Zeit gerührt, bis das anfangs gebildete schwerlösliche 2,4-Dinitrophenylhydrazinhydrochlorid nahezu vollständig gelöst ist. Man filtriert nun von Spuren unlöslichen Rückstandes ab und gibt 0.5 g des Ketoläthers unter Umrühren zu. Nach kurzer Zeit scheidet sich das Hydrazon als hellgelbe Krystalle ab, die nach einer halben Stunde abgesaugt, sukzessiv mit verdünnter Salzsäure, Wasser und Alkohol gewaschen und im Vakuum-Exsikkator über Chlorcalcium getrocknet werden. Ausbeute 1.3 g, Schmelzp. 193~194°. Nach zweimaligem Umkrystallisieren aus Äthylacetat erhält man reines 2,4-Dinitrophenylhydrazon als orangegelbe Säulen, welche in heissem Alkohol schwer, in heissem Äthylacetat etwas leichter löslich sind. Ausbeute 1.1 g, Schmelzp. 198~198.5°.

Analyse: 4.465 mg Subst. gaben 7.622 mg CO<sub>2</sub> und 1.988 mg H<sub>2</sub>O  
 3.970 mg Subst. gaben 0.671 ccm N<sub>2</sub> (18.5°, 755 mm)  
 C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>N<sub>4</sub> (282.1) Ber. C 46.79 H 5.00 N 19.85%  
 Gef. " 46.55 " 4.98 " 19.67%



*Methoxymethyl-n-propyl-ke-ton oder 1-Methoxy-pentan-2-on (II).*

Es wurde aus 50 g *n*-Propylbromid, 9.7 g Magnesiumspänen, 20 g Methoxyacetonitril und Äther dargestellt. Es bildet farblose bewegliche Flüssigkeit. Ausbeute 13 g, Siedep. ca. 117°/175 mm.

Analyse:	3.575 mg Subst.	gaben 8.188 mg CO <sub>2</sub> und 3.358 mg H <sub>2</sub> O
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	Ber. C 62.03 H 10.34%
	Gef. "	62.46 " 10.51%

*Semicarbazon des Methoxymethyl-n-propyl-ke-ton's:* 4 g krystallisiertes Natriumacetat und 1.2 g Semicarbazid-hydrochlorid werded in 20 ccm Wasser gelöst, mit 1.0 g des Ketoläthers und etwas Alkohol versetzt. Nach längerem Stehen wird der abgeschiedene Niederschlag abgenutscht. Der in Benzol leicht lösliche Teil wird aus einer Mischung von Bezol und weing Petroläther wiederholt umkrystallisiert. So erhält man das reine Semicarbazon, das in Benzol und alkohol leicht, in Wasser ziemlich leicht löslich ist. Schmelzp. 97~98°. Es wurde über Chlorcalcium und Paraffin getrocknet und analysiert.

Analyse:	4.412 mg Subst.	gaben 7.857 mg CO <sub>2</sub> und 3.504 mg H <sub>2</sub> O
	4.488 mg Subst.	gaben 0.942 ccm N <sub>2</sub> (19°, 752.6 mm)
	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Ber. C 48.52 H 8.73 N 24.25%
	Gef. "	48.57 " 8.89 " 24.30%

*2, 4-Dinitrophenylhydrazon des Methoxy-n-propyl-ke-ton's:* 0.5 g 2, 4-Dinitrophenylhydrazin, 0.44 g (1.5 Mol) Ketoläther und 15 ccm wasserfreier Alkohol werden in einem evakuierten geschlossenen Rohr zwei Stunden in kochendem Wasserbade erhitzt, die noch heisse klare Lösung wird mit soviel Wasser versetzt, bis die Trübung beginnt, und stehen gelassen. Das Hydrazon scheidet sich dabei als hübsche lange Säulen ab, die abfiltriert, mit etwas Methylalkohol nachgewaschen, getrocknet und aus wasserfreiem Alkohol umkrystallisiert werden. 0.4 g löst sich in 10 ccm Alkohol; Schmelzp. 128.5~129°. Ausbeute sehr gut. Zur Analyse wurde es bei gewöhnlicher Temperatur über Chlorcalcium getrocknet.

Analyse:	3.890 mg Subst.	gaben 6.975 mg CO <sub>2</sub> und 1.988 mg H <sub>2</sub> O
	4.671 mg Subst.	gaben 0.448 ccm N <sub>2</sub> (19°, 758.8 mm)
	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	Ber. C 48.63 H 5.45 N 18.91%
	Gef. "	48.90 " 5.72 " 18.61%

*Methoxymethyl-n-butyl-ke-ton oder 1-Methoxy-hexan-2-on (III).*

Eine Lösung aus 95.9 g (0.7 Mol) *n*-Butylbromid, 17 g (0.7 Mol) Magnesium und 250 ccm Äther wird mit 39 g (0.55 Mol) Methoxyacetonitril in gleichem Volumen Äther versetzt. Die Reaktion ist zweckmässig durch Wasser von etwa 15° zu regulieren. Die Ausbeute an analysenreinem Produkte beträgt 23 g. Wasserklare, bewegliche Flüssigkeit. Siedep. 131~132° bei 173 mm. Nach 3-monatigem Aufbewahren in evakuiertem Rohr bleibt es fast ungefärbt.

Analyse:	4.434 mg Subst.	gaben 10.539 mg CO <sub>2</sub> und 4.278 mg H <sub>2</sub> O
----------	-----------------	---



4.033 mg Subst.	gaben	9.623 mg CO <sub>2</sub> und 3.933 mg H <sub>2</sub> O
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	Ber.	C 64.61      H 10.77%
	Gef.	" 64.32; 65.11    " 10.80; 10.91%

*Semicarbazon des Methoxymethyl-n-butyl-ketons*: Darstellung wie bei I aus 4 g krystallisiertem Natriumacetat, etwa 2 ccm Wasser und Semicarbazidhydrochlorid und dazu 1.15 g Ketoläther und wenig Alkohol. Der Reihe nach aus Benzol-Petroläther, Benzin vom Siedep. 80~100° und vom Siedep. 60~70° umkrystallisiert. Schneeweisse lange Säulen vom Schmelzp. 95°. Es löst sich ziemlich leicht in Wasser, leicht in Äther und Benzol, aber schwer in Petroläther vom Siedep. unter 60°, selbst bei Erwärmen. Um 0.6 g zu lösen braucht man etwa 50 c.c. Benzin. Beim Erkalten dieser Lösung scheidet es sich zuerst als Öl ab, das doch bald zu Krystallmasse erstarrt. Nach dem Trocknen über Chlorcalcium-Paraffin wird es analysiert.

Analyse:	3.013 mg Subst.	gaben	5.670 mg CO <sub>2</sub> und 2.574 mg H <sub>2</sub> O
	3.752 mg Subst.	gaben	7.073 mg CO <sub>2</sub> und 3.063 mg H <sub>2</sub> O
	4.174 mg Subst.	gaben	0.797 ccm N <sub>2</sub> (17.5°, 758.8 mm)
	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> N <sub>3</sub>	Ber.	C 51.30      H 9.16      N 22.44%
		Gef.	" 51.32; 51.41    " 9.56; 9.13    " 22.39%

*2, 4-Dinitrophenylhydrazon des Methoxymethyl-n-butyl-ketons*: Darstellung wie bei II. Es krystallisiert aus Methylalkohol in hellgelben, seidenglänzenden, biegsamen und etwa 4 mm langen Nadeln. Ziemlich leicht löslich in heissem Methyl- und Äthylalkohol; Schmelzp. 93°.

Analyse:	3.462 mg Subst.	gaben	6.440 mg CO <sub>2</sub> und 1.923 mg H <sub>2</sub> O
	3.398 mg Subst.	gaben	6.238 mg CO <sub>2</sub> und 1.850 mg H <sub>2</sub> O
	4.096 mg Subst.	gaben	0.627 ccm N <sub>2</sub> (17.7°, 762 mm)
	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	Ber.	C 50.29      H 5.85      N 18.10%
		Gef.	" 50.73; 50.07    " 6.21; 6.09    " 18.10%

*Methoxymethyl-isoamyl-keton oder 1-Methoxy-5-methyl-hexan-2-on (IV).*

Aus 42.4 g Isoamylchlorid, 9.7 g Magnesium, 22 g Methoxyacetonitril und 120 ccm Äther erhält man 22 g. Siedep. 117° bei 87 mm; ca. 125° bei 110 mm. Farblose, bewegliche Flüssigkeit.

Analyse:	4.056 mg Subst.	gaben	9.941 mg CO <sub>2</sub> und 4.098 mg H <sub>2</sub> O
	4.083 mg Subst.	gaben	10.106 mg CO <sub>2</sub> und 4.184 mg H <sub>2</sub> O
	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	Ber.	C 66.66      H 11.11%
		Gef.	" 66.84; 67.50    " 11.30; 11.46%

*Semicarbazon des Methoxymethyl-isoamyl-ketons*: Ausbeute an Rohprodukten beträgt 1.27 g aus 1.4 g des Ketoläthers, 1.2 g Semicarbazidhydrochlorid und 1.5 g Natriumacetat. Nach einmaliger Umkrystallisation durch Auflösen in 7 ccm heissem absolutem Alkohol und nachträglichen Zusatz von 35 ccm heissem Benzin wird es sofort rein. Schmelzp. 105~106°. Schneeweisse nadelförmige Krystalle. In Wasser nicht so leicht löslich wie die niederen Homologe.

Zur Analyse wurde es über Chlorcalcium-Paraffin zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Analyse: 4.323 mg Subst. gaben 8.484 mg CO<sub>2</sub> und 3.801 mg H<sub>2</sub>O  
 4.229 mg Subst. gaben 0.748 ccm N<sub>2</sub> (17°, 758.8 mm)  
 C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub> Ber. C 53.74 H 9.52 N 20.88%  
 Gef. " 53.52 " 6.84 " 20.76%

2, 4-Dinitrophenylhydrazon des Methoxymethyl-*n*-isoamyl-ketons: Darstellung aus 0.55 g des Ketoläthers, 0.69 g 2, 4-Dinitrophenylhydrazin und Alkohol; Ausbeute 1 g. Aus absolutem Alkohol umkrystallisiert, bildet es biegsame gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 109.5°. 0.5 g ist in etwa 10 g heissem Alkohol löslich.

Es wurde bei gewöhnlicher Temperatur über Chlorcalcium getrocknet und analysiert.

Analyse: 4.462 mg Subst. gaben 8.538 mg CO<sub>2</sub> und 2.609 mg H<sub>2</sub>O  
 3.214 mg Subst. gaben 6.135 mg CO<sub>2</sub> und 1.899 mg H<sub>2</sub>O  
 4.181 mg Subst. gaben 0.620 ccm N<sub>2</sub> (18.5°, 760.8 mm)  
 C<sub>14</sub>H<sub>20</sub>O<sub>5</sub>N<sub>4</sub> Ber. C 41.83 H 6.22 N 17.28%  
 Gef. " 52.19; 52.06 " 6.54; 6.61 " 17.39%

Bei dieser Arbeit habe ich von Herrn Prof. Dr. U. Suzuki Anregung und Rat erhalten, wofür ich ihm auch hier meinen besten Dank ausspreche.

### Literatur

- (1) T. HIGASI und S. MARUYAMA: *Bull. I. P. C. R.*, **7** (1929), 934~939 (Japanisch).
- (2) D. GAUTHIER: *A. Ch.*, [8], **16** (1909), 289~358; siehe auch M. SOMMELET: *Bull.*, [4], **1** (1907), 384~390.
- (3) *loc. cit.*

## Sterilising Action of Acids.

Second Report.—Sterilising action of saturated monobasic fatty acids. (1)

Sogo TETSUMOTO.

(Received November 11, 1932.)

I studied on the sterilising action of mineral acids on microorganisms having the certain vital force and resisting power.

I reported on the Bul. of the Agr. Chem. S. of Japan<sup>(1)</sup> about the sterilising action of the same molecular concentration and pH, the effect of anions, undissociated molecules and that I made the comparative studies about the effect of sterilising power of each mineral acids. Following to above study, I



studied the sterilising action of saturated monobasic fatty acid ( $C_nH_{2n+1} \cdot CO_2H$ ) on microorganisms to ascertain the effects of the number of C atom, pH, the same molecular concentration, the chemical construction, anions, and undissociated molecules on the sterilising action.

### Experiment.

#### (1) Experimental methods.

I took the same methods those I reported before on the Bul. of Agr. Chem. S. of Jap<sup>(1)</sup> already. So that now I record the name of used microorganisms and the resisting power for phenol aqueous solution for convenience.

Name of microorganism	Staphylococcus pyogenes aureus	Bac. typhosus	Proteus vulgaris, Hauser	Vib. Cholerae
Phenol aq. solution, times by weight	75	90	100	175
surviving	5	+	+	+
period,	10	+	±	±
(minut)	15	—	—	—

+ ..... alive    — ..... perished    ± ..... sometimes perished or sometimes alive,

#### (2) Reagents.

I used saturated monobasic fatty acids  $C_nH_{2n+1} \cdot CO_2H$ : such as 13 acids.

Formic, Acetic, Propionic, Butyric, Isobutyric, Valeric, Isovaleric, Caproic, Isocaproic, Cenanthylic, Pelargonic, Capric.

Except Formic acid I used reagents manufactured by Kahlbaum Co. or Merck Co. and made lower dilute concentration than  $N/10$ .

#### (3) Concentration and pH of reagents.

Reagents are all weak organic dilute acid solutions and have no action such as buffer. So that pH of each acid must be found by next formulae.

$$pH = \frac{1}{2} p KHA - \frac{1}{2} \log C$$

KHA ..... electric dissociation constant of acids.

p ..... changed sign of logarithm of KHA.

C ..... concentration of reagents ..... normality.

As electric dissociation constants of Caprylic acid, Pelargonic acid and Capric acid are unknown, I determined pH of these acid by colorimetric method.

(4) Reagents, formulae, concentration and pH (calculated) are shown in Table 1.

#### (5) Performance of experiment.

Take 2 mg from each colonies of 24 hours standard agar slant culture of Staph. c. pyogen. aureus, Prot. vulgaris, Hauser, Bac. typhosus and Vib.

Table 1.

number of C atom	acids	chemical formulae	pH of N/10	pH of N/100	pH of N/1000	smell	taste
C <sub>1</sub>	Formic	H·CO <sub>2</sub> H	2.32	2.83	3.33	on N/100 slightly sour	on N/100 slightly sour
C <sub>2</sub>	Acetic	CH <sub>3</sub> ·CO <sub>2</sub> H	2.87	3.37	3.87	"	"
C <sub>3</sub>	Propionic	CH <sub>3</sub> ·CH <sub>2</sub> ·CO <sub>2</sub> H	2.93	3.43	3.93	"	"
C <sub>4</sub>	Butyric	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> )·CO <sub>2</sub> H	"	"	"	on N/100 slightly unpleasant sour	"
"	Isobutyric	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH·CO <sub>2</sub> H	"	"	"	"	"
C <sub>5</sub>	Valeric	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ·CO <sub>2</sub> H	2.89	3.39	3.89	on N/100 fruitlike	"
"	Isovaleric	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH·CH <sub>2</sub> ·CO <sub>2</sub> H	"	"	"	"	"
C <sub>6</sub>	Caproic	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ·CO <sub>2</sub> H		3.41	3.91	on N/100 slightly unpleasant sour	"
"	Isocaproic	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·CH·(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ·CO <sub>2</sub> H		"	"	"	"
C <sub>7</sub>	Oenanthylic	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> ·CO <sub>2</sub> H		3.44	3.94	"	"
C <sub>8</sub>	Caprylic	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ·CO <sub>2</sub> H			4.8	on N/1000 slightly unpleasant sour	on N/1000 no taste
C <sub>9</sub>	Pelargonic	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> ·CO <sub>2</sub> H			"	"	"
C <sub>10</sub>	Capric	CH <sub>3</sub> ·(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> ·CO <sub>2</sub> H			"	"	"









[illegible]

We know following facts by results noted in Table 2, 3, 4.

The sterilising power of formic acid ( $C_1$ ) is stronger than any of acids from  $C_2$  to  $C_5$  on each concentration.

From caproic acid ( $C_6$ ) according to the increase of the number of C atom, the solubility of acids to water greatly diminishes, but the sterilising power increases very strongly. Caprylic acid ( $C_8$ ), pelargonic acid ( $C_9$ ) and capric acid ( $C_{10}$ ) are very strong, above all capric acid has the strongest sterilising power.

( 6 ) Colloration of sterilising action between Normal and Iso compound.

Table 5. Colleration of sterilising action between Normal and Iso-Fatty acids affecting on microorganisms.

Butyric } Valeric } Caproic } These 3 series of acids have the same pH on *N/10*.  
Isobutyric } Isovaleric } Isocaproic } *N/100*, *N/1000*. According to this, the difference  
of sterilising power is not due to pH.

Suspension 0.1 c.c. added	Staph. c. pyogenes aureus												Proteus vulgaris, Hauser.															
	N/10				N/100				N/1000				N/10				N/100						N/1000					
Surviving period	Minut			Hour	Hour				Hour				Minut				Minut		Hour				Hour					
	45	60	90	2	3	6	9	12	24	36	48	72	15	20	30	45	60	90	2	3	6	9	12	24	36	48	72	96
Butyric acid	+	+	—	—	+	+	+	—	+	±	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	—
Isobutyric "	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—
Valeric "	+	+	—	—	+	+	+	—	+	—	—	—	+	±	—	—	+	+	±	—	—	+	+	—	—	+	+	—
Isovaleric "	+	+	+	—	+	+	+	±	—	+	+	±	—	+	+	+	—	+	+	+	±	—	+	+	±	—	+	+
Caproic "					±	—	—	—	±	—	—	—					+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	
Isocaproic "					+	+	—	—	+	±	—	—					+	+	±	—	—	+	±	—	—	—	—	
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	

Suspension 0.1 c.c. added	Bac. typhosus												Vib. cholerae													
	N/10				N/100				N/1000				N/10				N/100				N/1000					
Surviving period	Minut				Minut		Hour		Hour				Minut		Minut				Minut				Hour			
	20	30	45	60	90	2	3	6	9	9	12	24	36	48	1	2.5	2.5	5	15	20	30	30	45	60	90	2
Butyric acid	+	+	-	-	+	+	±	-	-	+	+	+	-	-	±	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Isobutyric "	+	+	+	-	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Valeric "	+	±	-	-	+	+	-	-	-	+	+	±	-	-	-	-	+	+	±	-	-	+	+	±	-	-
Isovaleric "	+	+	±	-	+	+	+	-	-	+	+	+	±	-	±	-	+	+	+	±	-	+	+	+	-	-
Caproic "					+	-	-	-	-	±	-	-	-	-			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isocaproic "					+	+	-	-	-	+	+	-	-	-			+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Contral	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Suspension 0.5 c.c. added	Bac. typhosus												Vib. cholerae													
	N/10			N/100			N/1000			N/10			N/100			N/1000										
Surviving period	Minut			Minut	Hour			Hour			Minut			Minut			Minut			Hour						
	45	60	90	90	2	3	6	9	12	24	36	48	72	1	2.5	5	10	15	20	30	45	25	60	90	2	3
Butyric acid	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	±	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Isobutyric "	+	±	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	±	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Valeric "	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Isovaleric "	+	±	-	+	+	+	±	-	+	+	+	-	-	+	±	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
Caproic "				+	±	-	-	-	±	-	-	-	-				±	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isocaproic "				+	+	+	±	-	+	+	-	-	-				+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Control	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Suspension 0.5 c.c. added	Staph. c. pyogenes aureus															Proteus vulgaris, Hauser											
	N/10			N/100			N/1000			N/10			N/100			N/1000											
	Minut	Hour		Hour			Hour			Minut	Minut	Hour		Hour													
Surviving period	90	2	3	3	6	9	12	24	36	24	36	48	76	96	30	45	60	90	2	3	6	9	12	24	36	48	
Butyric acid	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	+	—	—	+	+	±	—	—	+	+	—	—	
Isobutyric "	+	+	—	+	+	+	+	±	—	+	+	+	±	—	+	+	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	
Valeric "	±	—	—	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+	±	—	—	+	+	—	—	
Isovaleric "	+	+	—	+	+	+	+	±	—	+	+	+	—	—	+	±	—	+	+	±	—	—	+	+	+	—	
Caproic "				+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—				+	—	—	—	—	+	—	—	—	
Isocaproic "				+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—				+	+	—	—	—	+	±	—	—	
Control	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

(7) Sterilising action at the same pH of mono basic fatty acids.

To know the sterilising action of monobasic fatty acids and strong mineral acids on the same pH, I made solutions of pH 3.0 and pH 4.0 and examined.



The results are noted on Table 6.

Table 6. Sterilising action at the same pH of monobasic fatty acids.

Acids pH 3.0	Surviving period																				
	Staph. c. pyogen. aur.					Prot. vulgar. II.					Bac. typhosus					Vid. cholerae					
	Hour					Minut					Hour					Minut					
	2	3	6	12	24	45	60	90	2	3	6	90	2	3	6	9	1	2.5	5	15	20
Formic acid	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	±	-	-	+	+	+	-	-
Acetic "	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Butyric "	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isobutyric "	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
Valeric "	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Isovaleric "	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
HNO <sub>3</sub>	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
HCl	+	+	+	±	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Control	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Acids	pH	Surviving period																	
		Staph. e. pyogen. aur.									Prot. vulgar. H.								
		Minut			Hour						Minut			Hour					
		20	30	12	24	36	48	72	96	120	1	2.5	5	6	9	12	24	36	48
Formic acid	4.0	+	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Acetic "	"	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Propionic "	"	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Butyric "	"	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Isobutyric "	"	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-
Valeric "	"	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Isovaleric "	"	+	+	+	+	+	±	-	-	-	+	+	+	+	+	±	-	-	-
Caproic "	"	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Isocaproic "	"	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Oenanthylic "	"	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Caprylic "	4.8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Pelargonic "	"	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
Capric "	"	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
HNO <sub>3</sub>	4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HCl	"	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Control		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Acids		pH	Surviving period																		
			Bac. typhosus									Vib. cholerae									
			Minut			Hour						Minut			Hour						
			5	10	15	9	12	24	36	48	72	96	1	2.5	5	20	30	60	90	2	3
Formic	acid	4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Acetic	"	"	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-





Caproiate	N/100	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
Isocaproiate	"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oenanthyate	N/1000	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
Caprylate	"	+	+	±	-	-	+	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Pelargonate	"	+	+	±	-	-	+	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Caprinate	"	+	+	±	-	-	+	±	-	-	-	-	+	±	-	-	-	+	+	+	±	-	-	-
Control		+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

By above experiment we know next facts.

Anions of each acids from  $C_1$  to  $C_5$  have no sterilising power, but anions of acids— $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{10}$ —, have very weak sterilising power respectively.

(9) Relation to sterilising action of molecular concentration and pH.  
Results are as following table.

Table 8. Colloration of sterilising action between molecular concentration and pH.

Acids		Normal	Surviving period  pH	Staph. c. pyoger aur						Prot. vulgar.						Vib. choler.		
				Minut				Hour		Minut						Minut		
				30	45	60	90	2	3	6	15	20	30	45	60	90	1	2.5
Formic	acid	1/100	2.8	+	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
Acetic	"	1/10	2.9	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	±	—	—
Propionic	"	"	"	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	±	—	—
Butyric	"	"	"	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	±	—	—
Valeric	"	"	"	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—	±	—	—

Acids	Nolmal	Surv- iving per- iod	Staph. c. pyogen. aur.										Prot. vulgar. H						Vib. cholerae					
			Minut				Hour						Minut			Hour			Minut					
		pH	2.5	5	20	30	3	6	9	12	24	2.5	5	60	2	3	6	9	2.5	5	15	20	30	45
Formic acid	1/1000	3.3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	-
Acetic "	1/100	3.4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Propionic "	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Butyric "	"	"	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Valeric "	"	"	+	+	+	+	+	+	±	-	-	+	+	±	±	-	-	-	+	+	±	-	-	-
Caproic "	"	"	+	+	+	+	±	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Oenanthylic "	"	"	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capric "	N/1000	4.8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Control			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Formic acid  $N/100 \dots \text{pH } 2.8$ ,  $N/1000 \dots \text{pH } 3.3$

Acetic, Propionic, Butyric, } acid  $N/10 \dots \text{pH } 2.9$ ,  $N/100 \dots \text{pH } 3.4$   
Valeric, Caproic, }

If the sterilising action was determined only by pH, then the sterilising

power of  $N/100$  or  $N/1000$  of formic acid must be stronger than those of  $N/10$  or  $N/100$  of acetic, propionic, butyric, valeric, caproic acid respectively. But facts are quite contrary. And these anions have no sterilising power.

By these facts we know that the molecular concentration of fatty acids have competent sterilising power on microorganism.

Comparing the sterilising action of the same pH and the same molecular concentration of saturated monobasic fatty acids, caproic acid and oenanthic acid are stronger than any of acids from formic to isovaleric acid.

Above all caprylic ( $C_8$ ), pelargonic ( $C_9$ ), capric ( $C_{10}$ ) acids ( $\dots N/1000$ , pH 4.8) are extraordinary stronger than any of acids from formic to caproic acids ( $\dots N/100$ , pH 3.4).

These anions have very weak sterilising power. By above facts sterilising action of caprylic acid, pelargonic acid and capric acid are due to the undissociated molecule.

### Conclusion

I studied the sterilising action of 13 kinds of saturated monobasic fatty acids from formic ( $C_1$ ) to capric ( $C_{10}$ ), on putrefactive bacteria, *Bac. typhosus* and *Vib. cholerae*.

Molecular concentration of these acids are more dilute watery solution than  $N/10$  respectively.

Results are as follows:

- (1) In the same molecular concentration, the sterilising power of formic acid ( $C_1$ ) is stronger than any other acids ( $C_2$ ) to isovaleric ( $C_5$ ). 6 acids—from acetic to isovaleric—, have nearly the same sterilising power.
- (2) According to the increase in the number of C atom, from caproic acid the solubility of reagents to water greatly diminishes, but the sterilising power becomes greatly increase. Caprylic ( $C_8$ ), pelargonic ( $C_9$ ), capric ( $C_{10}$ ), these 3 acids have specially very strong sterilising power.
- (3) The sterilising action of lower fatty acid such as formic to isovaleric ( $C_5$ ) is due to pH chiefly, but the concentration of undissociated molecules also gives somewhat strong effect upon sterilising action.
- (4) Anions of saturated monobasic fatty acids have no sterilising power or have very weak sterilising power.
- (5) The sterilising action of 3 acids, caprylic, pelargonic, capric, is chiefly due to the action of undissociated molecule. pH and anions of these acids have subsidiary action.
- (6) Normal compounds have stronger sterilising power than Iso compounds.



- (7) Mineral acids such as  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (ortho) have stronger sterilising power than any of saturated monobasic fatty acids from formic to isocaproic acid on the same molecular concentration.
- (8) Saturated monobasic fatty acid have stroger sterilising power than any of mineral acid such as  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , on the same pH.

I express profound thanks for Dr. Y. Tohyama and Dr. S. Kojima for their kind advices for the experiment.

### Literature

- (1) Sogo Tetsumoto: Bullet. of the Agric. Chem. Soc. of Japan, Vol. 8, 1932.
- (2) Landolt-Börnstein: Physikalisch-chemische Tabellen II, 1922.
- (3) I. M. Kolthoff: Der Gebrauch von Farbindicatore, 3 Auflage, S. 6, 1926.

## Über die Protease und Amylase des Blutes der Seidenraupe (*Bombyx Mori*, L.).

Von

Kazuo YAMAFUJI.

(Aus d. Biochem. Institut d. Landw. Abteil. d. Kaiserl. Kyushu-Univ. zu Fukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 14. Dezember 1932)

Um zu einer Aufklärung über die Ernährung, die Physiologie und die Phathologie der Seidenraupe zu kommen, sind selbstverständlich Forschungen über das Blut der Larve unerlässlich. Bezüglich der chemischen Bestandteile des Blutes sind bereits von verschiedenen Seiten studien angestellt worden, aber es ist noch wenig über die darin vorkommenden Enzyme bekannt. Einige Forscher haben im Blute der Larve der Seidenraupen Tyrosinase, Invertase, Katalase, Protease und Amylase qualitativ nachgewiesen. Verf. möchte nun über seine Forschungen über die beiden letztgenannten Enzyme berichten.

### I. Über die Protease.

(1) Feststellung der Proteasewirkung :— Man erhält das Blut der Larven indem man ihnen die Füße abschneidet. Das austrende Blut wird in einem Gefäß mit Toluol gesammelt und sofort gebraucht. Als Pufferlösungen dienten M/10 Zitrat-, M/15 Phosphat- und M/10 Glykokoll-Gemische nach

Sörensen. Als Substrat wurde 0.5%ige Kaseinlösung von der pH 10.92, die durch Lösen von 5 g Kasein in 10 ccm N/10 Natronlauge und einer kleinen Menge Wasser und weiter mit Wasser auf 1 Litre aufgefüllt wurde, benutzt. Die Substratlösung wurde mit der Pufferlösung und dem mit 0.85%iger NaCl-Lösung verdünntem Blut gemischt. Nach einer bestimmten Zeit wurde das ungespaltene Kasein mit 1.5%iger Trichloressigsäure gefällt und nephelometrisch bestimmt.

(2) Einfluss der Acidität auf die Enzymwirkung :— In folgendem gibt der Verf. ein Beispiel aus den zahlreichen Ergebnissen, wie er sie im Journ. Agr. Chem. Soc. Japan (Japanisch) dargestellt hat.

1 ccm 0.5%ige Kaseinlösung + 3 ccm Pufferlösung + 1 ccm mit 0.85%iger NaCl-Lösung, fünffach verdünntes Blut, Temp. 22°, Wirkungsdauer 19 Stunden.

pH	mg gespaltenes Kasein	Kaseinspaltung %	pH	mg gespaltenes Kasein	Kaseinspaltung %
1.54	1.61	32.2	6.66	0.99	19.8
1.91	1.67	33.4	7.17	1.08	21.6
2.36	2.17	43.4	7.71	1.14	22.8
3.11	1.58	31.6	8.52	1.51	30.2
3.82	0.44	8.8	8.93	1.50	30.0
6.24	0.894	17.8	9.54	0.84	16.8

(3) Einfluss der Temperatur auf die Enzymwirkung :—

Ein Beispiel : 1 ccm 0.5%ige Kaseinlösung + 2 ccm Pufferlösung + 1 ccm 4fach verdünntes Blut.

pH	2.38		8.52	
Versuchszeit	65 Min.		55 Min.	
Temp. (°C)	mg gespaltenes Kasein	Kaseinspaltung %	mg gespaltenes Kasein	Kaseinspaltung %
8	0.12	3.0	—	—
20	0.61	15.3	0.24	6.0
25	0.69	17.3	0.45	11.3
30	0.79	19.8	0.54	13.5
35	0.95	23.9	0.63	14.8
40	1.12	28.0	0.77	19.3
45	0.84	21.0	0.65	14.0
50	0.63	15.8	0.51	12.3
65	0.52	13.0	0.12	3.0
15	0.20	5.0	0.05	1.3

(4) Beziehungen zwischen den Rassen und dem Wachstum der Seidenraupen und der Wirksamkeit der Protease :—



2 ccm 0.5%ige Kaseinlösung+3 ccm. Zitrat-salzsäuregemisch+1 ccm 5fach verdünntes Blut,  
Temp. 31°. pH 2.38. Versuchszeit 24 Stunden.

In den 5ten Alter	1ter Tag		3ter Tag		6ter Tag	
	gespaltenes Kasein		gespaltenes Kasein		gespaltenes Kasein	
Rasse	mg	%	mg	%	mg	%
Japan-110	4.75	51.9	—	—	4.75	51.9
Japan-Gin. × Europa-7	4.53	49.6	4.14	45.3	4.14	45.3
Japan-110 × Europa-7	4.63	50.7	4.22	4.22	4.65	50.3
China-7 × Japan-Gin.	4.34	47.5	4.34	47.5	4.70	51.4
Europa-7 × Japan-110	4.61	50.4	—	—	4.85	53.1

(5) Der Unterschied zwischen der Kaseinspaltbarkeit des Bluts bei Männchen und Weibchen der Larve :—

2 ccm 0.5%ige Kaseinlösung+3 ccm Pufferlösung+1 ccm 5fach verdünntes Blut. pH 2.38,  
Versuchsdauer 20 Stunden.

	♀Nr. 1	♀Nr. 2	♀Nr. 3	♀Mittel	♂Nr. 1	♂Nr. 2	♂Nr. 3	♂Mittel
mg gespaltenes Kasein	4.33	4.25	4.29	4.29	4.76	4.72	4.81	4.76
Kaseinspaltung %	43.3	42.5	42.9	42.9	47.6	47.2	48.1	47.6

## II. Über die Amylase.

(1) Feststellung der Amylasewirkung :— Die Gewinnung des Bluts und der Gebrauch der Pufferlösung waren dieselben wie in dem Experiment über die Protease. Zur Mischung der 5%igen Stärkelösung und der Pufferlösung wurde das mit 0.85%iger NaCl-Lösung verdünnte Blut addiert und nach bestimmter Versuchsdauer der entsandene, reduzierende Zucker mittels der Methode von Bertrand bestimmt.

(2) Einfluss der Acidität auf die Amylasewirkung :—

Ein Beispiel: 3 ccm 5%ige Stärkelösung+5 ccm Pufferlösung+1 ccm 3fach verdünntes Blut,  
Temp. 31°, Wirkungszeit 24 Stunden.

pH	ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	mg Maltose	Spaltung %	pH	ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	mg Maltose	Spaltung %
5.20	1.6	14.3	6.5	7.17	5.0	45.4	20.7
5.81	4.2	38.1	17.4	7.60	3.2	28.2	13.1
6.18	6.0	55.3	25.2	8.04	2.4	21.6	9.8
6.61	6.2	56.5	25.8	8.52	2.2	19.8	9.0

(3) Einfluss der Temperatur auf die Enzymwirkung :—

Ein Beispiel: 4 ccm 5%ige Stärkelösung + 4 ccm Pufferlösung + 2 ccm 5fach verdünntes Blut, pH 6.18, Versuchsdauer 90 Min.

Temp. °C	20	25	30	35	40	45	55	65	75
ccm 0.1% KMnO <sub>4</sub>	3.0	3.6	4.4	4.8	4.0	1.6	0.9	0.4	0.2

(4) Beziehungen zwischen den Rassen und dem Wachstum der Seidenraupen und der Wirksamkeit der Amylase :—

Angewandt: 3 ccm 5%ige Stärkelösung, 4 ccm Phosphatgemisch, 1 ccm 5fach verdünntes Blut, pH 6.18, Temp. 31°, Versuchszeit 24 Stunden.

In den 5ten Alter	Rasse	Japan-110	Japan-Gin. × Europa-7	Japan-110 × Europa-7	China-7 × Japan-Gin.	Europa-7 × Japan-110
1ter Tag	ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	2.3	1.5	2.0	1.6	2.0
	mg Maltose	20.7	13.0	18.0	14.3	18.0
	Spaltung %	15.7	10.2	13.7	10.9	13.7
3ter Tag	ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	—	2.4	3.3	8.8	—
	mg Maltose	—	21.6	29.7	77.0	—
	Spaltung %	—	16.4	22.6	58.5	—
6ter Tag	ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	3.2	3.8	2.9	2.9	3.3
	mg Maltose	28.8	34.2	26.1	26.1	29.1
	Spaltung %	21.9	26.0	19.1	19.1	22.6

(5) Der Geschlechtsunterschied in der Verzuckerungskraft des Bluts bei der Seidenraupe :—

Angewandt: 6 ccm 5%ige Stärkelösung, 8 ccm Pufferlösung, 1 ccm 5fach verdünntes Blut, pH 6.18, Temp. 28°, Versuchsdauer 20 Stunden.

	♀Nr. 1	♀Nr. 2	♀Nr. 3	♀Mittel	♂Nr. 1	♂Nr. 2	♂Nr. 3	♂Mittel
ccm 0.5% KMnO <sub>4</sub>	2.10	2.25	2.10	2.15	1.50	1.95	2.10	1.82
mg Maltose	18.9	20.3	18.9	19.4	13.4	17.6	18.9	16.6
Spaltung %	7.2	7.7	7.2	7.4	5.1	6.8	7.2	6.4



### **Zusammenfassung.**

- (1) Die protease des Bluts der Seidenraupe zeigt zwei ausgesprochene pH-Optima, nämlich pH 2,3 und pH 8,8. Das Temperaturoptimum liegt bei 40°.
- (2) In der proteolytischen Wirkung des Bluts besteht kein Unterschied in den Rassen und in den Wachstumperioden der Seidenraupen, aber diese Wirkung ist bei den Männchen etwas stärker als bei den Weibchen.
- (3) Die Blutamylase der Seidenraupe zeigt die optimal Aktivität bei pH 6,5 und das Temperaturoptimum liegt bei 35°.
- (4) Unter fünf Rassen der Seidenraupen besteht kein Unterschied in den Wirksamkeit der Blutamylase. Die Amylasewirkung wird mit dem Wachstum der Seidenraupe stärker und ist auch bei den Weibchen etwas stärker als bei den Männchen.

---

## **Über die Begünstigung des Azotobacter-Wachstums durch mineralische Stoffe aus Bodenextrakten.**

Von

K. KONISHI und T. TSUGE.

(Eingegangen am 12, Dezember, 1932)

(Folgende Untersuchungen wurden im Laboratorium für Bakteriologie der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem und im Agrikulturchemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Kyoto, Japan, ausgeführt. Wir sprechen Herrn Oberregierungsrat Dr. C. Stapp und Herrn Dr. H. Bortels für die Anregung zu diesen Untersuchungen und für viele Ratschläge unseren herzlichen Dank aus. Ebenso sind wir den Herren Prof. Osugi, Prof. Kimura, Dr. Iwamura, und Dr. Miyanisi für mancherlei Rat zu Dank verpflichtet.)

Die für Entwicklung und Wachstum des Azotobacters in synthetischen Nährlösungen notwendigen oder nützlichen Stoffe wurden schon oft von verschiedenen verfassern eingehend untersucht. Einige von solchen Stoffen wurden für Azotobacter als lebensnotwendig, andere als stimulierend wirkend angesehen, und Nährlösungen, die 10 und mehr anorganische Substanzen enthielten, wurden

als geeignete Nährböden empfohlen. So wurden von Ashby eine sehr gute synthetisch hergestellte und von Meyerhof und Burk und von Wolff ähnliche, etwas modifizierte Nährlösungen vorgeschlagen. Jedoch vermochten nach Krzemieniewski (1901, 1907) und Christensen (1915) Reinkulturen von *Azotobacter* in N-freier Nährlösung bei Gegenwart von frischer oder sterilisierter Erde mehr N aus der Luft zu fixieren als in Nährlösung ohne Erde. Christensen hat gemeint, dass für die N-Bindung nicht nur die in der Nährlösung gewöhnlich vorhandenen Stoffe, sondern noch irgendwelche Bestandteile des Bodens notwendig seien. Bortels hat neuerdings eine erhebliche Wirkung von Erdextraktasche beobachtet. Er hat Erde mit Wasser extrahiert und den Extrakt einer Mannit Nährlösung zugesetzt. Dann hat er gefunden, dass bei Verwendung solcher-Erdextrakte, die bei neutraler bis alkalischer Reaktion gewonnen wurden, ein sehr viel kräftigeres *Azotobacter*wachstum stattfindet als ohne Zusatz von solchen Auszügen aus Erdextraktaschen.

Es gibt viele Möglichkeiten, die Wirkung von Erdextrakten zu erklären. Man glaubte, dass diese auf in den Extrakten vorhandene Salze des Eisens oder Aluminiums beruhe, oder dass Kolloide der Hydroxyde des Eisens oder Aluminiums oder die in geringer Menge vorhandenen organischen Substanzen hierfür verantwortlich zu machen seien. Wir nahmen mit Bortels an, dass sich im Erdextrakt auf die N-Bindung des *Azotobacters* günstig wirkende anorganische Bestandteile befinden müssen. Bortels hatte ermittelt, dass Salze des Molybdäns (1930) und solche des Vanadins (bisher noch unveröffentlicht!), in geringer Menge der Nährlösung zugesetzt, *Azotobacter* zu mindestens ebenso energischer N-Bindung befähigen wie Erdextraktasche, und zwar Vanadin in etwas geringerem Masse als Molybdän.

Wir wollten nun versuchen, die Anwesenheit solcher Elemente in den Erdextrakten nachzuweisen und bedienten uns dabei der spektroskopischen Methode, da nach Lundegardh (1929) und Iwamura (1931) die Spektralanalyse eine zuverlässige Mikromethodik ist.

Wir haben 1 kg mit  $\text{CaCO}_3$  versetzter Erde aus Dahlem mit 1 L aqua dest. bei 2 Atm. extrahiert, den Extrakt in der Quarzschale zur Trockene eingedampft und verascht. Aus dieser Asche wurde ein Auszug mit heissem Wasser hergestellt und, wenn nötig, mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  neutralisiert. Dann wurde daraus eine Nährlösung mit Dextrose und mineralischen Salzen bereitet entsprechend der Stammlösung, die sich wie folgt zusammensetzte:

Aqua dest.	100 ccm	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Dextrose	2.0 g	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.1 g	$\text{CaCO}_3$	0.5 g

Als Versuchsgefässe dienten 750 ccm fassende Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Glas. Der auf Möhren-Agar gewachsene junge Stamm von *Azotobac-*

ter chroococcum wurde in die Nährlösungen eingepflegt, die dann 5 Tage im Brutschrank bei 27~28°C gehalten wurden. Am Ende der Versuchsdauer liessen die Kolben mit Erdextraktasche eine deutliche Trübung erkennen, und der N-Gewinn betrug 3.8 mg auf 100 ccm, während die Kulturen ohne Erdextraktasche nur Spuren von Stickstoff enthielten. Ferner haben wir gleiche Versuche mit zwei Arten von Erdextraktaschen, die sich auf das Azotobacterwachstum günstig ("gut") oder nicht günstig ("schlecht") auswirkten, und einer solchen von Tschernosemboden durchgeführt. Nach 10 Tagen Versuchsdauer war der N-Gehalt der Kultur mit "guter" Erdextraktasche von 0.91 mg auf 6.75~12.79 mg und derjenige der Kultur mit "schlechter" Extraktasche auf 3.10~4.20 mg gestiegen. Ein Zusatz von Tschernosem-Asche vermochte die N-Bindung wenig zu erhöhen. Aus weiteren Versuchen ging hervor, dass die Kulturen in Nährlösungen, die grössere Mengen von Extraktaschen der "schlechten" Erde oder des Tschernosem enthielten, ebenfalls gut wuchsen. Wahrscheinlich waren in diesen Aschen die Elemente, die der Entwicklung des Azotobacters in N-freier Nährlösung dienlich sind, in viel geringerer Menge enthalten.

Ähnliche Untersuchungen wurden mit 12 Erdproben aus 6 verschiedenen Gegenden ausgeführt, die sich untereinander durch den Grad ihrer Fruchtbarkeit unterschieden. Bei Zusatz der Asche aus fruchtbarer Erde war der erhaltene N-Gewinn nicht immer bedeutend. Nur bei Verwendung des N armen Erdextraktes selbst fanden wir wieder den Parallelismus zwischen Fruchtbarkeit der Erde und N-Gewinn.

Die Spektralanalyse mit Hilfe des Lichtbogens nach Kimura oder Nitchie diente zur Bestimmung der Elemente der Erdextraktasche. Die hierzu notwendige Apparatur bestand aus den beiden Kohlen-Elektroden und einem Spektroskop E 3 von Adam Hilger. Als untere Elektrode benutzten wir eine Kohle von 9 mm Durchmesser, die mit einer Bohrung von 5 mm Durchmesser versehen wurde, welche die zu untersuchende Probe aufnehmen sollte. Wir hielten zwischen beiden Elektroden immer einen Abstand von 4 mm, benutzten den Gleichstrom von 110 Volt und arbeiteten gewöhnlich mit 5 Ampere. Vor den Spaltkopf wurde eine Hartmann'sche Spaltblende mit drei Öffnungen befestigt, wodurch wir 3 vergleichbare Spektrogramme, und zwar Eisen als Standard, Kohle mit Probe und Kohle allein gleichzeitig aufnehmen konnten. Die auf den Ilford-Panchromatic-Platten aufgenommenen Linienspektren wurden unter Hilger's Mikrometer beobachtet, um die Lage der den unbekannten Elementen zukommenden Linien zu bestimmen und ihre Wellenlänge zu berechnen. Zuweilen verwendeten wir zum Vergleich das Spektrogramm eines Elementes, das wir in der Probe vermuteten, in reiner Lösung. Wenn sich dann die typischen Linien deckten, so bewiesen wir



damit das Vorhandensein des fraglichen Elementes.

Nunmehr untersuchten wir die "gute" Erdextraktasche aus Berlin-Dahlem spektrographisch nach der oben geschilderten Methode. Ausser den Elementen, die in der Regel in grösseren Mengen vorkommen, konnten wir mit Bestimmtheit die nachfolgenden Elemente in sehr geringer Menge nachweisen:

Titan, Barium, Strontium, Lithium, Chrom, Vanadin, Zink, Nickel.

Es erhebt sich nun die Frage, ob in Anwesenheit von einigen Salzen dieser Elemente die N-Bindung energischer verläuft als in gewöhnlicher Nährlösung. Um Klarheit zu bekommen, liessen wir in den einzelnen Versuchsserien jeweils ein Salz eines der oben genannten Elemente in verschiedenen Konzentrationen einwirken. Mit Hilfe der Erlenmeyer-Technik von Burk fanden wir, dass Vanadin die N-Bindung durch Azotobacter zu fördern vermag, wenn es in Mengen von  $M/10,000 \sim M/100,000$  als Natriummetavanadat oder Vanadium-Chlorid gegeben wird, und dass den anderen obengenannten Elementen hierbei keinerlei Bedeutung zukommt. Die Reinkultur hatte  $0.5 \sim 0.7$  mg N in 100 ccm gebunden, bei Zusatz von Vanadin-Salz dagegen  $4.3 \sim 6.7$  mg.

In dem Spektrogramm des Wasserauszuges aus "guter" Erdextraktasche erschienen die Linien  $\lambda 3102$ ,  $3113$ ,  $3118$ ,  $3184$  und  $3185$ , die für die Anwesenheit des Vanadins entscheidend sind, während in dem Spektrogramm der "schlechten" Erdextraktasche die Zahl der Linien abnahm, und  $\lambda 3183$ ,  $3184$  und  $3185$  nur schwach ausgeprägt waren. Bei Tschernosem waren auffälligerweise alle Vanadin-Linien verschwunden. Bei den anderen 12 Erdextraktaschen und ihren Auszügen war in einem Fall die Intensität der letzten Vanadin-Linien sehr schwach und in den übrigen Fällen fast unsichtbar und kaum vergleichbar.

Auf Grund dieser Ergebnisse können wir behaupten, dass die Menge des Erdextraktasche enthaltenen Vanadins einen wichtigen Faktor darstellt, von welchem die Grösse der N-Bindung durch Azotobacter abhängig ist.

---

## Electro-Conductivity of Textile Fibres

By

Risaku TSUNOKAYE and Gitaro ENOMOTO.

(Received 28, December, 1932)

(Imperial Institute of Silk Industry of the Ministry of Commerce and Industry, Yokohama, Japan.)

### Summary.

The method of determining the electro-conductivity of the textile fibres and the influences of the treatments on the electro-conductivity of silk have been investigated with the following results.

- (1) The electro-conductivity of textile fibres can be determined comparatively by the measurement of a constant electric quantity which is charged in the quadrant electrometer, in the length of time which is needed to discharge it through the test piece of the textile fibre.
- (2) The electro-conductivity of raw silk which is stored in places of different moisture and temperature for two years (temp.  $5\sim 30^{\circ}\text{C}$ , relative humidity  $40\sim 90\%$ ) can not be distinguished.
- (3) The electro-conductivity of the rayon is generally larger than that of the natural silk. Among the rayons, the electro-conductivity of acetate silk is much less than that of the others.
- (4) When raw silk is degummed off, the electro-conductivity of it decreases. The electro-conductivity of the scoured silk by means of soap or free caustic soda solution is greater than that of the silk scoured by enzyme such as pancreatin, therefore, if one wishes to get silk of high electric insulation, it is preferable to scour it by enzyme.
- (5) The electro-conductivity of the scoured silk by means of water of high temperature and pressure (over  $121^{\circ}\text{C}$ , two atmospheric press.) is greater than that of the silk scoured by soap or enzyme on behalf of its destruction of fibroin by the treatment under high temp. and pressure.
- (6) When the scoured silk by means of soap solution is treated by NaOH of different concentration, the electro-conductivity of these silks differs, that is, the electro-conductivity of the silk treated by the more concentrated NaOH, is greater than that of the less concentration. The reason of this does not depend only on the destruction of the fibroin, but is much influenced by the sodium combined with it. This conclusion comes from the facts that. a) When the concentration of NaOH is very low ( $N/400$ ) the strength and elongation of the treated silk is not decreased, while the electro-conductivity of it is increased compared with that of the untreated. b) Furthermore, when the treated silks with NaOH are immerced into a diluted sulphuric acid the electro-conductivity of the sulphuric acid is decreased according to the degree of concentration of NaOH which is used to treat the silk, that is, the more the sodium combined with the silk fibre the greater its power of decreasing the electro-conductivity of the sulphuric acid when the silk is immerced into it.

- (7) When silk is weighted by tin-salt, the electro-conductivity of it is increased according to its degree of weighting. This increase of electro-conductivity is not caused by the destruction of the fibre, but by the weighted salt, because the strength and elongation of the silk (at the course of weighting) is increased to some extent by the weighting, that is to say, the destruction of the silk by weighting must occur in the storage. From this result the announcement "The tin-weighting of the silk will make it less liable to become dirty." seems to be reasonable.
- 

## Content of Vitamin C in Canned Satsuma Orange

(*Citrus unshiu*, Marc.)

A preliminary report.

By

R. SAITO.

(Received February 4, 1933)

### 1. Introduction.

*Unshiu* (Satsuma orange)—a principal mandarine of Japan, also palatable and nutritious, is liable to be infected with mould when it is preserved for a long period. This defect can adequately be removed through canning, which is a recently developed industry in this country.

There are now two different methods in canning: The one consists in treating the peeled orange with caustic alkali to dissolve the envelope of segments out, the other with acid instead of alkali. The latter so-called "acid process", was invented by B. Hamaguchi in the Institute of Dietary Science, Agricultural Department of Tokio Imperial University, and recently improved thoroughly (Jap. pat. No. 95669). The author estimated vitamin C content in Satsuma orange which was canned by the "acid process".

### 2. Process of Canning (Acid process).

From peeled orange each segment is detached and immersed in 10 per-



cent hydrochloric acid at 90°C. After 30~40 sec., when the pectinous substance forming the wall of segments is almost decomposed into the pectinic acid, it is drained and washed with water. The mass of vesicles is then put into a concentrated solution of salts in which the remaining hydrochloric acid can be diffused out by osmotic action. By few hours' washing with clean water, traces of hydrochloric acid and salts can effectually be removed. A sugar solution of Bé 26° is then poured on and they are packed and sterilized for 10 min. at 100°C.

### 3. Chemical composition of *Citrus unshiu*.

The fresh orange used for the canning, is *Citrus unshiu* produced in Shizuoka District. The chemical composition of the fresh fruit is as follows: (the rind is taken off, pressed, filtered and analysed.)

	Total sugar in 100 c.c. gr.	Reducing sugar in 100 c.c. gr.	Free acid as citric %
in fresh juice of orange	7.133	2.345	1.10

The content of each can of the orange, here referred, is as follows:

Total content	Fruit flesh	Sugar solution
327 gr.	224 gr.	98 c.c.

The chemical composition of the above is given below.

		Specific gravity	Total Sugar in 100 c.c. gr.	Reducing sugar in 100 c.c. gr.	Free acid as citric %
3 days after, canning	Flesh	—	12.725	4.100	1.18
	Sugar soln.	—	19.325	4.275	0.59
47 "	Flesh	—	17.100	7.075	0.92
	Sugar soln.	—	17.100	7.075	0.69
80 "	Flesh	1.061 1.062	—	—	—
	Sugar soln.	1.062 1.063	—	—	—
360 "	Flesh	—	8.750	5.750	0.76
	Sugar soln.	—	8.750	5.750	0.76

### 4. Animal Experiment.

As animals for this purpose, guinea-pig weighing about 250 grms. were

used. The author used a basal diet of oats and wheat bran with milk (50 c.c. per head per day) autoclaved at 120°C for one hour and supplemented with 5~6 drops of cod-liver oil.

The samples tested were prepared by filtering the pressed juice of canned orange (the mass of vesicles) which had been packed three months ago (from 100 grs. of the mass of vesicles 70~75 c.c. of pressed juice was obtained). Preliminary feeding period lasted 7~17 days, during which the above basal ration was supplemented with cabbage. Throughout the tests male were used.

(a) Preventive experiment.

The following table shows the result when 5~8 c.c. of pressed juice of the canned orange (mass of vesicles) were given per day.

No.	Pressed juice given, c.c.	Days of experiment	Body weight of animal			Symptom of Scurvy
			at the beginning of test	maximum	after the test	
2	0	23	268	320	198	severe
10	0	28	259	304	211	—
3	5	58	241	436	423	no
4	5	58	284	304	299	"
5	8	58	282	465	454	"
6	8	58	281	394	359	"
7	8	58	244	443	436	"

The data obtained in this experiment show that 5 c.c. per day is sufficient to prevent a guinea-pig from scurvy. In the course of this test no symptom of scurvy could be recognized, while the control animals fed solely on vitamin C free diet, showed clearly the symptoms of scurvy even after 12 days. Decline of body weight occurred and death followed soon after. On post-mortem examination all the sign of scurvy were fully recognized.

(b) Curative experiment.

After feeding two guinea-pigs on vitamin C free basal diet, when the symptom of scurvy was distinctly observed, 10 c.c. of the pressed juice of the canned orange (mass of vesicles) were administered. One recovered from the disease, gaining body weight rapidly and the sign of complete recovery was also anatomically affirmed. The experimental result is as follows:

No.	Days of feeding on vitamin C free-diet	Days of pressed juice given	Body weight of Animal			Symptom of Scurvy
			Before test	at Beginning of test	after test	
1	19	31	277	224	188	slightly
8	17	40	241	228	359	—

### 5. Summary.

- (1) Canned mandarine orange (*Citrus unshiu*) contains rich amount of vitamin C equalling to more than  $1/3$  of fresh lemon or orange juice.
- (2) According to Dr. R. Fujimaki,<sup>(1)</sup> fresh *Unshiu* contains about  $3/8$  of vitamin C of fresh lemon juice and Y. Iwasaki<sup>(2)</sup> 4~5 c.c. of fresh juice of *Unshiu* is sufficient to cure a ginea-pig of scurvy.
- (3) From these investigations, the author will maintain that vitamin C content in fresh *Unshiu* can hardly be affected by canning where acid process be used. This result coincides well with Delf's<sup>(3)</sup> experiment on the vitamic C content of canned orange.

The author wishes to express his best thanks to Dr. U. Suzuki for the guidance of this work and also to Mr. K. Murai for his assistance.

### Literature

- (1) R. Fujimaki: Vitamin, 253, 1930.
- (2) Y. Iwasaki: On Vitamin C in Satsuma Orange (*Unshiu Mikan*), Bul. Agr., chem. Soc. (Japan), 1, 17.
- (3) E. M. Delf: Bioch. J., 19, 1925.

---

## Investigation on the Influence of Aerial-Earth Circuit on the Biological Activities.

### I. Influence on *Azotobacter chroococcum*.

By

Arao ITANO, Ph. D.

(Received February 6, 1933)

The influence of aerial-earth circuit on the biological activities was investigated, and as the first report, the results obtained with *Azotobacter chroococcum* are presented in this paper.

The term "aerial-earth circuit" is employed here to designate the circuit between the atmosphere and the earth.

Hitherto the most biological investigations have been undertaken independent of the aerial-earth circuit or in other words, under the insulated condition. It is especially true with those concerned the microorganisms. Under the



usual laboratory conditions, the microorganisms are insulated from the aerial-earth circuit so that the results obtained through such the procedure may not be the same as those in the closed circuit. Again it seems to be more evident in cases of the soil microorganisms whose habitat is the soil where the influence of such circuit as well as the earth potential is presumably marked.

In view of these considerations, it was attempted to ascertain experimentally the influence of the aerial-earth circuit first on *Azotobacter chroococcum* which is well known organism for its interesting physiological activity, namely the fixation of atmospheric nitrogen.

### Experimental Procedure.

An acclimatized, young culture of *Azotobacter chroococcum* in Ashby's liquid medium was used to inoculate six flasks out of eight Erlenmyer flasks (250 c.c. volume) which contains 100 c.c. of Ashby's medium of the following properties, shown in Table I and II, in each, and the flasks were treated as described below :

Table I. Chemical Properties of Ashby's Liquid Medium.

Composition	Quantity
Mannitol [ $C_6H_8(OH)_6$ ]	10.0 g.
Magnesium sulfate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.2
Mono-potassium phosphate ( $KH_2PO_4$ )	0.2
Sodium chloride (NaCl)	0.2
Calcium sulfate ( $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.1
Calcium carbonate ( $CaCO_3$ )	5.0
Distilled water	1,000.0 c.c.

Table II. Physical Properties of Ashby's Liquid Medium.

Properties	Values
pH	7.40
Specific gravity	1.0077
Viscosity	0.98984
Specific conductance	0.00074
Surface tension	79.559 (dynes per sq. cm.)
Osmotic pressure	2.069

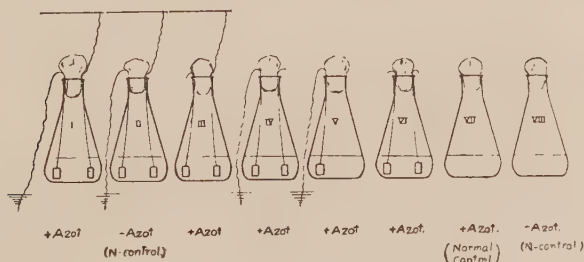
No previous record in regard to the physical properties of the medium is found so that they were determined realizing their significance in this investigation.

The flasks in the series were treated as follows :

- Flask I. Two platinum electrodes ( $1.5 \times 2.0$  cm.) were inserted in the medium, and one of them was connected to an aerial antenna of twelve meters long and the other was earthed by a main water pipe. After the medium was inoculated with 1 c.c. of 48 hours old culture, the flask was kept in an incubator at  $30^{\circ}\text{C}$ .
- Flask II. Same as Flask I except it was not inoculated with the organism, and served as a control for Flask I in regard to the nitrogen fixation.
- Flask III. Same as Flask I except no earth connection was made.
- Flask IV. Same as Flask I but no connection to the antenna was made.
- Flask V. Same as Flask IV but only one electrode was inserted and earthed.
- Flask VI. Same as Flask IV except no earth connection was made.
- Flask VII. Same as Flask VI without insertion of any electrode.
- Flask VIII. Same as Flask VII without inoculation, serving as the nitrogen control under the normal condition.

These arrangements are illustrated diagrammatically as follows :

Diagrammatical Arrangement.



At the end of every 24 hours, with a few exceptions, the following observations were made :—

1. Macroscopical observations ;
  - a) The turbidity of culture.
  - b) The formation of surface membrane.
2. Microscopical observations ;
  - a) The morphology of individual cell especially in regard to the cell division.
  - b) The count of total cells was made by the use of hemocytometer and with a specially made cover glass in combination with Breed's ocular disc.

3. Nitrogen determination ;

At every five days intervals, the nitrogen was determined by Pregel's





Notes:— T : turbidity, M : membrane, Y : young, growing cells, P : pleomorphic cells, (The cells were observed through the microscope while the count was made.)

± : doubtful, — : no change or none, + : slight or few, # : marked or many, ## : heavy or numerous, ### : very heavy or numerous.

Table III indicates that Flask I became turbid sooner than the rest, and those flasks which were earthed became more turbid than Flask VII which is the normal control. The formation of the surface membrane was in the same order as the turbidity. These results indicate plainly that the completion of circuit has a marked influence and also the earthing alone has a very beneficial influence on the growth of *Azotobacter chroococcum*. The stimulation effect was observed after 24 hours and at the end of 48 hours, the difference was noted very plainly.

## 2. Microscopical observations:—

The total number of cells was counted directly by means of microscope so that the morphological description of an individual cell was made at the same time. The results are given in Table IV while the conditions of cells were already noted in table III.

Table VI. Growth of *Azotobacter chroococcum* at Different Age.

Number of hours,	Number of Flasks,							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Initial,	366*	—	366*	366*	366*	366*	366*	—
24	12.112	—	5.746	6.288	5.887	5.112	5.232	—
48	35.211	—	12.154	21.408	23.183	13.883	12.957	—
72	38.028	—	18.352	24.873	28.535	18.197	17.549	—
96	44.028	—	20.985	28.676	29.661	20.197	19.605	—
120	45.915	—	26.662	30.140	30.028	27.323	26.000	—

Notes:— \* Number of organisms per c.c. in thousand.

Table IV indicates that the growth of *Azotobacter chroococcum* was influenced markedly by closing the circuit or earthing alone. The count after five days remained practically constant and the pleomorphic cells began to appear in some of the flasks making the correct counting difficult so that no further record is given after that. Flask I exceeded all the rest and Flask IV and V were much better than Flask III, VI and VII which were very similar. The stimulation began to show its influence after 24 hours. Also as it was noted in Table III, the young, multiplying cells were most numerous in Flask I throughout the investigation and the pleomorphic cells began to appear later than the rest, which seems to indicate that the closed circuit stimulates the cell metabolism. Again Flasks IV and V were better than the others in this respect, indicating that the earthing alone had some effect.

### 3. Physiological observation:—

Although the nitrogen determinations were made at every five days intervals by Pregel's micro-Kjeldahl method, here only the results obtained at the end of fifteen days by the ordinary Kjeldahl method for the total nitrogen will be given in Table V.

Table V. Quantity of Nitrogen fixed.

Number of flasks,	Total uitrogen fixed in fifteen days per 100 c.c. of medium.
I	4.099 mg
II	—
III	2.830
IV	3.339
V	3.309
VI	2.680
VII	2.724
VIII	—

Table V indicates that much greater amount of nitrogen viz. more than one and one half times of the normal control, was fixed in Flask I where the aerial-earth circuit was closed, and even the earthing alone fixed much more than the normal control. The connection only to the antenna did not show any difference, as shown by the result in Flask III.

### Discussions.

The nature of the stimulation which was observed in this investigation may be electrical in nature, but no previous investigation was undertaken in regard to this phase of problem so far as the author is aware. The previous investigations which are concerned with the influence of electricity upon the microorganism as well as other organisms, seem to confine themselves, at least experimentally to electricity applied directly to the organisms, either galvanic or static form, and the influence observed by them may be considered as electro-chemical or the secondary influence in most cases.

The amount of electric current which passes through such a system as used in this investigation is governed primarily by the conductivity of the culture medium as well as the dielectrics of the system, and it must be a very small amount judging from the physical properties of the medium. No attempt however was made at this time to measure the current since it is very difficult to determine it accurately owing to the continuous change in the culture medium as the growth of the organism progresses as well as the irregularity of the atmospheric charge and the earth potential.

Since the physical properties of culture medium seem to have the great influence upon the physiological activities of organisms, they should receive more attention in the physiological investigation than ever before as well as the physical ecological factors.

### Summary.

The influence of aerial-earth circuit on *Azotobacter chroococcum* was investigated by cultivating it in the closed aerial-earth circuit, connecting it either to the antenna or to the earth, and comparing the results against the normal control which was grown under the ordinary laboratory condition. From the results obtained, the following summary may be made:

- (1) In the closed aerial-earth circuit, *Azotobacter chroococcum* was influenced markedly both culturally and physiologically. Its growth was more vigorous and fixed much more nitrogen than the rest.
- (2) Connection to the antenna alone did not have any influence.
- (3) Connection to the earth alone exerted better influence but was not so great as in the case of the closed circuit.

The principle underlying this investigation seems to be far reaching, scientifically as well as practically, and further investigations with various microorganisms are in progress.

---

## Studies on The Proteins Contained in Mulberry Leaves.

Part I. On the Kinds of the Protein-Nitrogen Contained in Mulberry Leaves, and the Comparison of the Quantities of the Protein-Nitrogen Contained in Different Parts of the Mulberry Tree.

By

Yukitaro KISHI.

*(From the Katakura Research Institute of Mulberry Culture, near Hashioji City, Japan)*

(Received February 10, 1933)

### Résumé.

(1) I made the following studies concerning the proteins contained in mulberry leaves, from the view-point of a student of mulberry culture.



(2) First of all, I tried to estimate the quantities of the proteins contained in mulberry leaves by ordinary method—a method usually practised in estimating the comparative quantities of the proteins contained in vegetable seeds. The method\*, as I adopted, is as follows:—

- First, the leaves are extracted with distilled water;
- Next, the residue left after treatment with distilled water is extracted with 10% solution of sodium chloride; and
- Then, the residue left after treatments with distilled water → 10% solution of sodium chloride is extracted with 70% alcohol; and
- Finally, the residue left after treatments with distilled water → 10% solution of sodium chloride → 70% alcohol is extracted with 0.2% solution of sodium hydroxide.

Now, the total quantity of the proteins thus extracted with the above-mentioned solvents was found to be smaller than the total quantity of all the proteins naturally contained in the mulberry leaves. I knew, therefore, that a large amount of proteins remained insoluble in these solvents and that they were retained in the residue.

Then, I treated this residue with 60% boiling alcohol containing 0.3% of sodium hydroxide<sup>(1)</sup>, and thus succeeded in extracting nearly all the proteins retained in the residue, i. e. the protein corresponding in quantity to the greater half of the total quantity of all the proteins naturally contained in the mulberry leaves.

(3) Thus, first estimating the quantities of the proteins by examining the results of the treatments with distilled water → 10% solution of sodium chloride → 70% alcohol → 0.2% solution of sodium hydroxide, in order; and next, treating the residue left after these treatments, by Osborne, Wakeman and Leavenworth's method, i. e. with 60% boiling alcohol containing 0.3% sodium hydroxide, in this way estimating the quantity of the protein thus extracted,—I have proposed, from the view-point of a student of mulberry culture, a method of estimating the comparative quantities of the proteins contained in mulberry leaves.

I also found, after estimating what is generally considered the total quantity of the proteins contained in the mulberry leaves by Stutzer's method, that there always still remained, in the filtrate obtained, no small amount of a protein that could be precipitated by half or complete saturation with ammonium sulphate; so I took the step to precipitate this remaining protein by complete saturation with ammonium sulphate. This precipitate I again dissolved in distilled water; next, by dialysis, I removed the ammonia from this proteinaceous liquid; and then, I estimated the quantity of the nitrogen contained in this liquid.

---

\* Osborne, Wakeman and Leavenworth: J. of Biol. Chem. 49, 63, 1921.

In this way, I also estimated the comparative quantities of the proteose contained in the filtrate which was prepared for the purpose of estimating the total quantity of the proteins contained in the mulberry leaves by Stutzer's method.

(4) Using the same method, I also estimated the comparative quantities of various kinds of protein-nitrogen contained in different parts of the mulberry tree, i. e. its leaves, its stems, its roots, its seeds, and its sap (the white milky juice that oozes out from the leaf-stalks where they are cut off).

Nearly all the proteins contained in the seeds were found to be amenable to the treatments\*\* with water→sodium chloride→alcohol→sodium hydroxide, in order.

With the roots, the results were nearly similar to the results with the seeds.

With the sap, the results were similar to the results with the seeds.

In other words, the proteins contained in the preservatory organs, and the translocating and flowing proteins, were found to be identical with the abovementioned proteins extracted by means of water→sodium chloride→alcohol→sodium hydroxide, in order.

Among these proteins, globulins predominated; and in the seeds and roots, glutelins came next to globulins, and were also found in great quantity.

On the contrary, the proteins contained in the leaves presented quite a different phenomenon, as has been referred to in (2). In this respect, the stems resembled the leaves more than the roots resembled the leaves, i. e. the total quantity of the proteins that could be extracted by means of water→sodium chloride→alcohol→sodium hydroxide, in order, was found to be about equal to the quantity of the protein that could be extracted from the residue thus obtained, with 60% boiling alcohol containing 0.3% of sodium hydroxide.

Now, considering the results of these experiments to estimate the comparative quantities of the proteins contained in different parts of the mulberry tree by a method proposed from the view-point of a student of mulberry culture, I prepared the following table, which gives in ratios the quantities of protein-nitrogen estimated in various ways, as against 100 of the total quantity of all the protein-nitrogen estimated by Stutzer's method. The figures in this table are based on the results of experiments on fresh materials.

Protein-nitrogen examined in various ways,	Leaves,	Seeds,	Sap,	Stems,	Roots,
Total quantity of all protein-nitrogen in materials, as estimated by Stutzer's method,	100	100	100	100	100

\*\* The condensed note of the treatments ( \* ) was mentioned on p. 38: and so forth; etc.

Nitrogen precipitated with cupric hydroxide in solution extracted by distilled water,...①	15.12	11.00	88.76	19.94	26.52
Nitrogen precipitated by saturation with magnesium sulphate in solution extracted by distilled water.	<u>12.77</u>	<u>4.25</u>	<u>85.47</u>	<u>13.04</u>	<u>19.49</u>
Nitrogen precipitated with cupric hydroxide but in capable of precipitation with magnesium sulphate in solution extracted by distilled water.	2.35	6.75	3.29	6.90	7.03
Nitrogen extracted with 10% solution of sodium chloride from residue left after treatment with distilled water,...②	<u>7.46</u>	<u>56.00</u>	<u>4.22</u>	<u>18.07</u>	<u>22.15</u>
Nitrogen extracted with 70% alcohol from residue left after treatments with water → sodium chloride,...③	4.41	0.82	0.85	9.00	5.70
Nitrogen extracted with 0.2% solution of sodium hydroxide from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol,...④	5.01	<u>20.44</u>	1.63	10.40	<u>15.49</u>
Total quantity of nitrogen extracted by four steps above, i. e. ①+②+③+④.	<u>33.39</u>	<u>88.26</u>	<u>95.47</u>	<u>57.43</u>	<u>69.87</u>
Nitrogen extracted with 60% boiling alcohol containing 0.3% sodium hydroxide, from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide.	<u>62.34</u>	7.60	2.17	<u>42.16</u>	<u>23.38</u>
Nitrogen extracted from residue left after treatment with hot alkaline alcohol, by decomposing said residue with 25% hot hydrochloric acid.	3.26	3.01	1.32	1.11	4.47
Nitrogen contained in residue left after treatment with hot hydrochloric acid.	0.56	0.71	0.31	1.05	1.43

Next, for the purpose of comparing the total quantity of the proteins that could be extracted from different parts of the mulberry tree by means of water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, with the quantity of the protein that could be extracted from the residue left after these treatments, by again managing this residue with the hot alkaline alcohol,—I prepared the following table, which gives in percentage the average quantities of these two types of proteins, based on the condensed results of experiments on various materials. The comparisons given in this table are twofold: on the one hand, the results of my experiments on various materials are compared with 100 of the total quantity of the protein-nitrogen contained in these materials, as estimated by Stutzer's method; and on the other hand, the same are compared with 100 consisting of the total quantity of the protein-nitrogen as estimated by Stutzer's method, plus the quantity of proteose-nitrogen contained in the



filtrate left after the experiments by Stutzer's method.

Materials experimented on.	Methods of estimation	An against 100 of total quantity of protein-nitrogen contained in materials, as estimated by Stutzer's method.		As against 100 consisting of total quantity of protein-nitrogen contained in materials, as estimated by Stutzer's method, plus quantity of proteose-nitrogen contained in filtrate left after experiments by Stutzer's method.	
		Total quantity of protein-nitrogen extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide.	Quantity of protein-nitrogen extracted with hot alkaline alcohol, from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide.	Total quantity of protein-nitrogen extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide.	Quantity of protein-nitrogen extracted with hot alkaline alcohol, from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide.
Liaves.		33.30	62.34	34.72	61.10
Stems, (Average for various stems experimented on.)		47.67	46.58	49.41	45.06
Roots, (Average for various roots experimented on.)		60.78	30.35	62.28	29.20
Sap, (i. e. white milky juice that oozes out from leaf-stalks where they are cut off.)		95.47	2.17	95.99	1.92
Seeds.		88.26	7.60	88.55	7.41

(5) After solving with the hot alkaline alcohol the residue of the mulberry leaves that was left after the treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, I also estimated the quantity of the phosphorus contained in this solution. The quantity of the phosphorus was far smaller than even the quantity of the protein contained in the same solution.

Also, after thus solving with the hot alkaline alcohol the residue of the mulberry leaves that was left after the treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, I always noticed that the solution bore a tinge of yellow colour. I am inclined to believe that this was caused by the presence of a flavone-like pigment.

(6) To sum up, a great part of the total quantity of all the proteins contained in mulberry leaves consists of a peculiar proteins, which are retained in the residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, and are soluble in the hot alkaline alcohol. In other words, the proteins contained in mulberry leaves have many points of difference from the proteins contained in vegetable seeds which have been studied hither to by many workers.

Part II. Concerning the Quantitative Changes of the Proteins  
Contained in Mulberry Leaves, as Considered  
with Relation to the Growth of these Leaves.

Résumé.

(1) I made the following studies concerning the quantitative changes of the proteins contained in mulberry leaves, as considered with relation to the growth of these leaves, using the same methods as used in my studies in Part I.

(2) The quantity of each protein contained in the mulberry leaves, calculated in dry leaves, was found to decrease with the growth of the leaves, in proportion as the total quantity of all the proteins contained in the same leaves, calculated in dry leaves, decreased with the growth of the leaves. In other words, if the total quantity of all the proteins contained in the leaves is taken as 100, it was found that the ratios of the total quantities of those proteins that could be extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, fell with the growth of the leaves. But, on the contrary, if the total quantity of all the proteins contained in the leaves is 100, the ratio of the quantity of the protein extracted with the hot alkaline alcohol, from the residue of the leaves left after the treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, was found to increase with the growth of the leaves.

Now, if the total quantity of the proteins extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, is taken as 100, the ratio of the quantity of the protein extracted with the hot alkaline alcohol, from the residue left after the aforementioned treatments, rose considerably with the growth of the leaves, as set forth in the following table:—

	Very young leaves,	Young leaves,	Mature leaves,	Overmature leaves,
Total quantity of protein-nitrogen extracted with water→sodium chloride→alcohol→sodium hydroxide,	100	100	100	100

Quantity of protein-nitrogen extracted with hot alkaline alcohol, from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide. (As compared with the foregoing.)	442	470	607	721
Total quantity of protein-nitrogen extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, plus quantity of proteose-nitrogen contained in filtrate left after experiments by Stutzer's method.	100	100	100	100
Quantity of protein-nitrogen extracted with hot alkaline alcohol, from residue left after treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide. (As compared with the foregoing.)	360	405	514	614

(3) To sum up, not only the total quantity of the proteins contained in mulberry leaves, calculated in dry leaves, decreased with the growth of these leaves, but also, the ratio of the quantity of the protein extracted with the aid of the hot alcohol from the residue left after the treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, to the total quantity of the proteins extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, rose considerably with the growth of these leaves. These phenomena show that the proteins contained in mulberry leaves undergo great change in quality as these leaves grow.

---

Part III. On the Relations in Quantity of the Proteins Contained in the Silkworm-Body and in Silk, to the Proteins Contained in mulberry Leaves, as Examined in Silkworms Fed on mulberry Leaves in Various Stages of Growth.

### Résumé.

(1) I stated in Part II that the proteins contained in mulberry leaves undergo great change in quality with the growth of these leaves. That is to say, if the total quantity of all the proteins contained in the leaves is taken as 100, the ratios of the total quantities of those proteins that could be extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, were found to fall with the growth of the leaves; while, on the contrary, the quantity of the protein extracted with the hot alkaline



alcohol from the residue of the leaves left after the treatments with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order (this protein occupies a good half of the total quantity of all the proteins contained in mulberry leaves), were found to increase with the growth of the leaves; also, if the total quantity of the proteins extracted with water → sodium chloride → alcohol → sodium hydroxide, in order, is taken as 100, the ratio of the quantity of the protein extracted with the hot alkaline alcohol, from the residue left after the aforesaid treatments, was found to rise considerably with the growth of the leaves.

Now, here in Part III, I made the following studies concerning the proteins contained in mulberry leaves and the culture of silkworms on mulberry leaves in various stages of growth.

(2) The weight of the silkworm-body, and the ratio of the quantity of the proteins contained in either the fresh or the dry silkworm-body, to the constant weight of the body, were always found to be larger if the silkworm had been fed on young leaves than if fed on mature leaves; and larger again if fed on mature leaves than if fed on over-mature leaves; that is, larger if fed on less matured leaves than if fed on more matured leaves. Consequently, of the proteins contained in the bodies of a hundred silkworms that had been fed on less matured leaves, was always found to be larger than the absolute quantity of the proteins contained in the bodies of any other hundred silkworms fed on more matured leaves. Also, the weight of the silk-gland of the silkworm, and the ratio of the weight of the silk-gland to the gross weight of the silkworm-body, were found larger if the silkworms had been fed on less matured leaves than if fed on more matured leaves. The weight of the cocoon (as examined in groups of 100 cocoons), and the ratio of the weight of the cocoon-silk to the gross weight of the cocoon  $\left( = \frac{\text{weight of cocoon silk}}{\text{gross weight of cocoon}} \times 100 \right)$ , were found larger in the same way as the foregoing. Consequently, the absolute weight of the silk taken from a hundred silkworms that had been fed on less matured leaves were found heavier than the absolute weight of the silk taken from any other hundred silkworms fed on more matured leaves.

To sum up, the quantity of the proteins contained in the silkworm-body and in cocoon silk were always found to increase in proportion to the degree of immaturity of the mulberry leaves used in feeding the silkworms.

The writer of these pages wishes to express his sincere gratitude to Professor Dr. Y. Okuda for his kind advice throughout these works (Part I, Part II and Part III).

昭和八年三月七日印刷

昭和八年三月十日發行

東京帝國大學農學部內

發行兼編輯者 後藤格次

東京帝國大學農學部內、日本農藝化學會

印刷者 稻垣秀實

東京帝國大學農學部內

印刷所 日本農藝化學會印刷部



